

인삼 사포닌류가 종양괴사인자의 생성 및 T 세포 증식에 미치는 효과

조재열[#] · 박지수 · 유은숙 · 백경업 · 박명환 · 한병훈*

(주)대웅제약 중앙연구소, *서울대학교 천연물과학 연구소

(Received November 25, 1997)

Effect of Ginsenosides from *Panax Ginseng* on TNF- α Production and T Cell Proliferation

Jae Youl Cho[#], Jisoo Park, Eun Sook Yoo, Kyong Up Baik,
Myung Hwan Park and Byung Hoon Han*

R & D Center, Daewoong Pharm. Co. Ltd., Sungnam 462-120, Korea

*Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

Abstract—To investigate the effects of ginsenosides from *Panax ginseng* on mitogenic responses in macrophages and splenocytes from murine, we examined the effects of representative protopanaxadiol and protopanaxatriol ginsenosides (Rb₁, Rb₂, Re and Rg₁) on tumor necrosis factor- α (TNF- α) production in murine macrophage cell line (RAW264.7 cells) stimulated by lipopolysaccharide (LPS) and T cell proliferation in splenocytes stimulated by concanavalin A (Con A). Among the ginsenosides tested, protopanaxadiol ginsenosides (Rb₁ and Rb₂) significantly inhibited TNF- α production in a dose-dependent manner. However, protopanaxatriol ginsenosides (Re and Rg₁) showed little inhibitory activity. The molar concentrations of Rb₁ and Rb₂ producing 50% inhibition (IC₅₀) of TNF- α production were 55.8 μ g/ml (48.0 μ M) and 31.8 μ g/ml (27.9 μ M), respectively. As a positive control, prednisolone also exhibited inhibitory activity with an IC₅₀ value of 21.7 μ M. In T cell proliferation, Rg₁ was not effective but Rb₁ and Re or Rb₂ significantly increased or inhibited at high concentration, 75 and 100 μ g/ml. In contrast, prednisolone showed potent inhibitory activity with an IC₅₀ value of 6.1 nM. These results suggest that ginsenosides may take part in the mitogen-induced signaling pathway for TNF- α production and T cell proliferation from macrophages and splenocytes.

Keywords □ Ginsenosides, TNF- α , T cell proliferation, mitogenic response.

인삼은 한국 뿐아니라, 동양권 및 미국 등에서도 그 효용성이 인정된 우수생약으로서 현재 전세계적으로 많은 사람들이 복용하고 있는 대표적인 생약이다. 그러나 아직도 인삼이 나타내고 있는 약리기전은 정확히 밝혀져 있지 않으며, 다만 항염, 항암, 항스트레스, 항산화 및 숙취제거 등의 다양한 치료효과를 나타내고 있는 것으로 알려져 있다.¹⁻⁵⁾ 또한 이들 약효에서 인삼의 개개 성분들이 나타내는 구체적인 약리기전 역시 명확히 확

인되지 않아 여전히 많은 연구가치를 지니고 있는 부분이다. 인삼은 주로 사포닌류와 비사포닌류로 구성되어 있으며, 현재 인삼이 나타내는 많은 약리작용은 주로 사포닌류들에 의해 나타나는 것으로 보고되고 있다.²⁾

사포닌 분획을 통해 확인한 면역작용에서 인삼의 역할은 면역계의 기능항진을 유도하거나 일부의 경우 *in vitro*에서는 오히려 면역계의 작용을 억제하는 것으로 보고되고 있다. 즉 T cell과 thymocytes, B cell, killer cell 및 hematopoietic progenitor cell의 증식을 유도하고 활성화를 통해 세포성 면역반응과 체액성 면역반응 및 자연면역성을 증폭시키는 것으로 알려져 있

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0342-41-7700 (팩스) 0342-731-7554

는^{6,7)} 반면에, 일부결과에서는 hydrocortisone과 같은 스테로이드성 약물(SAID)들처럼 강한 면역억제 효과를 나타낸다고 보고되어 있다.⁸⁾ 또한 cytokine의 경우 일부 사포닌 성분들(Rb₂, Rg₁ 및 Rc 등)은 저 농도에서 interleukin-1이나 TNF- α 의 분비를 촉진하거나,⁹⁾ 암 세포의 혈관신생 억제 및 직접 암세포 사멸을 유도하여 효과적인 항암작용을 나타내고 있는 것으로 보고되었다.^{3,10,11)} 그러나 이에 대한 인삼의 각 성분들이 나타내는 약리기전은 아직 명확히 밝혀져 있지 않으며, 특히 분자 수준에서의 연구 역시 여전히 미흡한 수준이다.

따라서 본 연구에서는 일차적으로 사포닌 개개 성분이 나타내는 면역작용에 대한 정확한 분자적 수준에서의 역할 연구를 목적으로 lipopolysaccharide(LPS)나 concanavalin A(Con A)와 같은 mitogen에 의해 자극받는 macrophage나 splenocytes를 이용하여 이들로부터 분비되는 TNF- α 나 T cell의 증식에 미치는 사포닌 단일성분들의 영향을 조사하여 이에 대한 조절작용 유무를 검토해보았다.

실험방법

시약 및 재료 - Fig. 1에 나타난 ginsenoside Rb₁, Rb₂, Re 및 Rg₁은 *Panax ginseng*으로 부터 추출된 것을

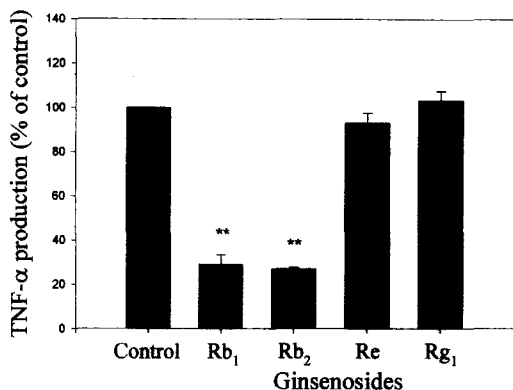


Fig. 1 - Effect of ginsenosides (Rb₁, Rb₂, Rc and Rg₁) from *Panax ginseng* on TNF- α production in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells (1×10^6 cell/ml) were stimulated with LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) in the presence of ginsenosides (at $100 \mu\text{g/ml}$). Supernatants were collected after 6 h and assayed by ELISA. Data represent mean \pm SEM of 3 observations. **p<0.01 compared to control.

사용하였으며, 순도는 99% 이상이었다. lipopolysaccharide(LPS, *E. coli* serotype 055 : B5), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), concanavalin A(Con A) 및 prednisolone은 Sigma(St. Louis, MO, USA)로부터, murine macrophage cell line인 RAW264.7 세포는 ATCC(Rockville, MD, USA)로 부터 구입하여 실험하였다. 또한 세포배양시 사용된 RPMI 1640 및 fetal bovine serum (FBS)은 Gibco사(Grand Island, NY USA)로부터 구입하였다. 그의 사용된 모든시약은 특급이상 및 Sigma 제품을 이용하였다. 초자의 경우 24 well plate는 Falcon(Becton Dickinson Com., Franklin Lakes, NJ, USA) 제품을, murine TNF- α enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit는 Amersham Life Science Co.(Little Chalfont, Buckinghamshire, U. K.)사로부터 구입하여 정량에 이용하였으며, microplate ELISA reader로는 Spectramax 250 microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A.)를 사용하였다.

실험동물 - 실험에 사용된 Balb/c mice(6 주령)는 B & K Universal사(Fremont, CA, USA)에서 구입하여 1주 이상 순화시킨 후 사용하였다.

사포닌류의 처리 - 사포닌류들의 배양액내 처리는 세포독성이 나타나지 않는 농도인 $100 \mu\text{g/ml}$ 이하에서 실시하였다. Rb₁, Rb₂, Re 및 Rg₁은 초기 $100 \mu\text{g/ml}$ 로 처리하여 TNF- α 억제 정도를 비교한 후 억제효과가 나타난 성분들에 대해서는 5, 10, 25, 50, 75, 및 $100 \mu\text{g/ml}$ 로 처리하여 농도의존성 및 IC₅₀값을 산출하였다. 또한 양성 대조 약물들은 구조적으로 유사한 스테로이드성 항염증 약물(prednisolone)로 하여 TNF- α 생성 및 T cell 증식 억제효과를 비교하였다. 약물은 propylene glycol 89.1%, EtOH 10% 및 dimethylsulfoxide (DMSO) 0.1% 비율로 조제된 vehicle을 100%로 하여 녹인 후 다시 배지를 이용하여 각각의 농도로 희석하였다. 또한 약물처리시 각 well당 vehicle의 농도는 RAW264.7 세포의 TNF- α 생성 및 T cell 증식에 영향을 미치지않는 농도인 0.1% 이하로 하였다.

In vitro TNF- α 생성 및 정량 - Murine macrophage 세포주인 RAW264.7세포를 penicillin(100 IU/ml) 및 streptomycin($100 \mu\text{g/ml}$)과 5%의 FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용해서 1×10^6 cell/ml의 농도로 조절한 후, 24 well plate에 접종하고, 5% CO₂

및 37°C에서 18시간 동안 전배양하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도로 조제된 시험물질 50 μ l와 450 μ l의 LPS(최종농도 1 μ g/ml) 함유 배지를 동시에 처리하여 배양하였다. 6시간 후 배지를 원심분리(12,000 rpm, 3분간)하고, 상층액 일부를 정량전까지 -20°C 이하에서 보관하였다. TNF- α 의 정량은 mouse TNF- α ELISA kit를 이용하여 정량하였다. TNF- α 의 정량 한계는 5 pg/ml 이하였으며 standard TNF- α 에 대한 표준곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

MTT assay에 의한 세포독성 평가 - LPS와 함께 처리된 약물들의 TNF- α 억제 효과가 세포의 괴사나 apoptosis 유도에 의한 세포수의 감소에서 기인된 것인지 확인하기 위해 TNF- α 정량법과 동일한 조건에서 MTT assay에 의한 세포생존율을 조사해봄으로써 Rb₁ 및 Rb₂의 세포독성을 평가해보았다.¹²⁾ RAW264.7 세포를 1×10^6 cell/ml의 농도로 24 well plate에 접종하고, 5% CO₂ 및 37°C에서 18시간 동안 전배양하였다. 이후 동일 농도로 조제된 약물을 처리하여 전배양과 동일 조건에서 24시간 배양하였다. 계속해서 MTT용액 (10 mg/ml phosphate-buffered saline, pH 7.4) 10 μ l를 첨가한 후 다시 4시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 aspiration으로 배지를 제거하고 200 μ l의 DMSO를 첨가하여 발색을 유도하였다. 흡광도는 540 nm에서 microplate ELISA reader를 이용하여 측정하였다.

T cell 증식 정량 - T cell 증식 assay는 T cell mitogen인 Con A를 이용하여 다음의 방법으로 실시하였다. Balb/c mice로 부터 무균조작으로 비장을 적출하고 주사기를 이용하여 차가운 RPMI 1640 배지로 비장세포를 분리하였다. 분리된 비장세포를 원심분리로 모은 후 0.83% ammonium chloride-20 mM Tris buffer(pH 7.4)를 이용하여 적혈구를 용해시켰다. 다시 Hanks' balanced salts solution 및 RPMI 1640 배지로 3회 세척후 10% FBS 함유 RPMI 1640 배지를 이용하여 세포를 5×10^6 cell/ml 농도로 96 well plates에 접종하였다. 여러 농도의 약물과 Con A(1 μ g/ml)를 동시에 처리하고 48시간 동안 배양하였다. T cell proliferation은 배양 44시간 경에 10 μ l의 MTT 용액을 넣고 4시간 추가 배양 후 10% sodium dodecyl sulfate(SDS) 용액으로 발색을 유도하고 microplate ELISA reader를 이용하여 565 nm에서 측정하였다.

통계처리 - 각 data는 Student's *t*-test를 이용하

여 실시하였으며 p값이 0.05이상일 때 유의성있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

TNF- α 생성에 미치는 영향 - Ginsenosides 및 대조약물(prednisolone)의 TNF- α 억제 효과를 Fig. 1과 2 및 Table I에 나타냈다. Fig. 1에서 처럼 100 μ g/ml의 농도에서 protopanaxatriol계 ginsenoside

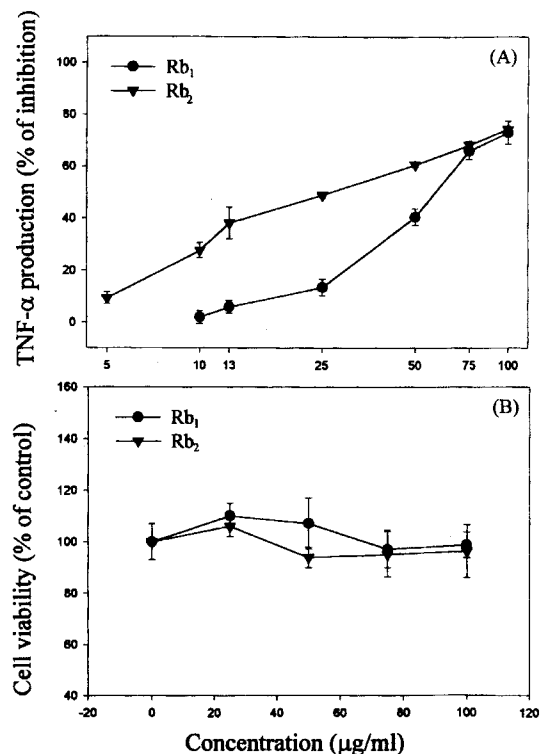


Fig. 2—Dose responses of Rb₁ and Rb₂ on TNF- α production from LPS-stimulated RAW264.7 cells (A) and cell viability of RAW264.7 cells (B). A: RAW 264.7 cells (1×10^6 cell/ml) were stimulated with 1 μ g/ml of LPS with various concentrations of Rb₁ and Rb₂. Supernatants were collected after 6 h and assayed by ELISA. B: RAW264.7 cells (1×10^6 cell/ml) were incubated with various concentrations of Rb₁ and Rb₂ for 24 h. Then, the cells were further incubated with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) for 4 h. Culture medium was discarded with aspiration and the cells were treated with 200 μ l of DMSO. Absorbance was read on an ELISA reader at 540 nm. Data represent mean \pm SEM of 4 observations.

Table I—The molar concentrations of Rb₁, Rb₂ and prednisolone producing 50% inhibition (IC₅₀) of TNF- α production in RAW264.7 cells stimulated by 1 μ g/ml of LPS for 6 h

Compound	IC ₅₀ value	
	μ g/ml	μ M
Rb ₁	55.8 \pm 2.1	48.0 \pm 2.1
Rb ₂	31.6 \pm 1.2	27.9 \pm 1.7
Prednisolone		21.3 \pm 3.9

RAW264.7 cells (1 \times 10⁶ cell/ml) were stimulated with 1 μ g/ml of LPS with various concentrations of Rb₁, Rb₂ and prednisolone. Supernatants were collected after 6 h and assayed by ELISA. Data represent mean \pm SEM of 3 observations.

인 Re와 Rg₁은 억제효과가 거의 나타나지 않았으며, 반면에 protopanaxadiol계 ginsenoside인 Rb₁과 Rb₂는 75% 이상의 유의성 있는 억제효과를 나타냈다. 또한 Rb₁과 Rb₂의 농도에 따른 억제효과를 조사해본 결과 5~100 μ g/ml 농도 범위에서 농도의존적인 억제효과 (Fig. 2A)를 확인할 수 있었으며, 이들 결과를 토대로 계산된 IC₅₀값은 Rb₁이 48.0 \pm 2.1 μ M이었고, Rb₂가 27.9 \pm 1.7 μ M이었다 (Table I). 따라서 ginsenoside에 의한 TNF- α 억제에는 분명한 구조적인 관련성이 있을 것으로 판단된다. 한편 대조 약물인 prednisolone 역시 유의성 있는 TNF- α 분비억제 효과를 나타내었으며, IC₅₀값은 21.7 \pm 3.9 μ M로 Rb₁과 Rb₂보다 유사하거나 낮았다. 그러나 이와같은 결과는 사람의 peripheral blood mononuclear cell(PBMC)에 Rb₁ 혹은 Rb₂를 0.2~20 μ g/ml 농도에서 T cell mitogen인 phytohemagglutinin(PHA)과 동시 처리시 오히려 TNF- α mRNA 발현을 증가시키는 것으로 보고한 Park 등 (1996)의 결과⁹⁾와는 다른 것으로 나타났다. 따라서 이와같은 결과는 세포와 mitogen의 종류에 따라 이들 사포닌류가 나타내는 cytokine분비에 미치는 영향은 매우 다양하게 작용할 수 있을 것으로 판단된다. 6시간 동안 LPS와 함께 처리된 Rb₁과 Rb₂의 TNF- α 억제 효과가 세포의 괴사나 apoptosis 유도에 의한 세포수의 감소에서 기인된 것인지 확인하기 위해 세포생존율을 조사해봄으로써 Rb₁ 및 Rb₂의 세포독성을 평가해보았다 (Fig 2B). 결과에서 처럼 두 약물은 정량된 억제농도에서 세포 생존율에 전혀 영향을 주지 않았다. 따라서 Rb₁과 Rb₂의 TNF- α 억제 효과는 LPS 자극시 발생하는 세포내 신호전달과정의 하나를 억제해서 나타나는 것으로 판단된다.

Rb₁과 Rb₂의 TNF- α 분비억제 기전은 확인되지 않았지만, 구조적인 유사성으로 볼 때 glucocorticoid receptor 매개에 의해서 TNF- α 분비억제를 나타내는 SAID의 작용 기전과 유사하거나,⁸⁾ 혹은 Rb₁과 Rb₂가 정제된 cAMP phosphodiesterase(PDE)에 대해 IC₅₀ 값으로서 150 μ M과 190 μ M 정도의 억제 효과를 나타낸다는 Nikaido 등(1984)과 Seo 등(1983)의 보고^{13, 14)}로 볼 때 세포내 축적된 cAMP의 매개에 의한 전사수준에서의 TNF- α 억제작용과 유사할 것으로 판단된다. 따라서 보다 자세한 기전연구가 계속해서 진행되어야 하겠다.

한편 종양의 전이과정은 필수적인 혈관신생과정이 요구되는데, 특히 이들과정을 매개하는 중요한 cytokine의 하나가 TNF- α 인 것으로 보고되고 있다.¹⁵⁾ 여러 연구자들은 Rb₂나 Rg₃와 같은 protopanaxadiol계 ginsenoside들이 종양세포들의 전이를 억제하는 것으로 보고하였는데,^{3, 10, 11)} 정확한 기전은 확인되지 않았다. 따라서 이와같은 보고들과 TNF- α 억제효과에 관한 본 결과로 볼 때 Rb₂나 Rg₃와 같은 protopanaxadiol계 ginsenoside들의 항전이효과는 간접적으로 TNF- α 의 생성 억제에서 기인될 수도 있을 것으로 판단된다.

또한 최근 TNF- α 가 류마타스성 관절염이나 천식 등과 같은 알려지나 만성염증 질환에서 다양한 병리적 역할을 매개하는 pro-inflammatory cytokine으로 보고 되면서,^{16~18)} Rb₁과 Rb₂의 TNF- α 억제에 관한 본 연구 결과는 protopanaxadiol계 ginsenoside가 이들 질환의 치료제로서 개발될 수 있는 가능성을 제시하는 *in vitro* 결과로 사료된다.

T cell 증식에 미치는 영향 - 75 및 100 μ g/ml 농도에서 사포닌류의 T cell proliferation에 미치는 효과를 Fig. 3에 나타냈다. 결과에서 처럼 Rb₁과 Re는 유의적인 증가작용을 나타냈으나, Rg₁은 대조군과 비교시 특이적인 영향을 미치지 않았다. 그러나 Rb₂는 Con A에 의한 T cell 증식을 유의적으로 억제하였는데, 이와같은 작용은 RAW264.7 세포나 splenocyte에 대한 세포독성 시험을 통해 비특이적인 세포사멸에서 기인된 약효가 아닌 것으로 확인되었다(Data not shown). 또한 Rb₂의 T cell 억제 작용이 cell line 수준에서도 억제하는지를 확인하기 위해 helper T(CD4+) 세포주인 Sup-T1 cell과 cytotoxic T(CD8+) cell이면서 interleukin-2 의존성 세포주인 CTLL-2 세포를 이용하

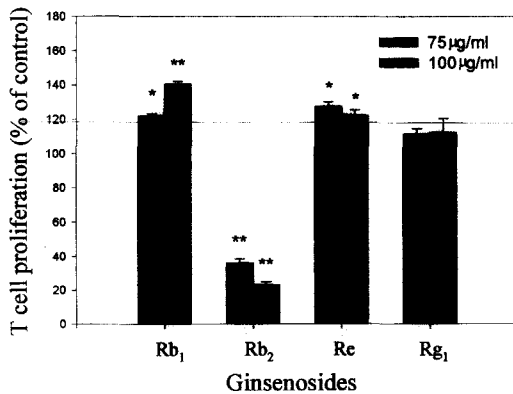


Fig. 3—Effect of ginsenosides (Rb₁, Rb₂, Rc and Rg₁) on T cell proliferation in splenocytes stimulated by Con A. Splenocytes (5×10^6 cell/ml) were stimulated with Con A ($1 \mu\text{g/ml}$) in the presence of various ginsenosides for 48 h. Then, the cells were further incubated with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) for 4 h. After treatment of 10% SDS solution ($10 \mu\text{l}$), absorbance was read on an ELISA reader at 565 nm.

Data represent mean \pm SEM of 4 observations.

* $p < 0.05$ compared to control.

** $p < 0.01$ compared to control.

여 억제효과를 조사했으나, 이들 세포주에서는 동일한 결과를 얻지 못하였다(unpublished data). 따라서 Rb₂의 T cell 증식 억제작용은 Con A 신호전달 과정적제와 관련이 있는 것으로 판단된다.

Rb₂의 T cell 증식 억제작용은 동일 농도에서의 TNF- α 억제 효과와 유사한 반면에, prednisolone은 IC₅₀값으로서 6.1 ± 1.3 nM로 1000배 이상의 강한 면역 억제작용을 나타내었다. 따라서 Rb₂의 작용은 Chong 등(1984)이 언급⁸⁾한 steroid-like effect와는 다른 억제 기전을 가질 것으로 예상된다.

한편 Park 등(1996)은 PHA를 처리한 PBMC의 T cell 증식에 대한 인삼 총조사포닌이 $64 \sim 128 \mu\text{g/ml}$ 에서 30% 정도 억제한다고 보고⁹⁾하였는데, 본 결과로 볼 때, 총조사포닌의 작용은 Rb₂의 효과에서 기인된 것으로 판단된다. 그러나 Chong 등(1984)은 동일조건에서 인삼추출물로서 $1.6 \mu\text{g/ml}$ 를 처리할 경우에도 매우 강한 억제효과를 나타낸다고 보고⁸⁾함에 따라, 인삼추출물에는 Rb₂와 같은 ginsenoside류 이외에 강한 억제효과를 가지는 약효성분이 함유되어 있을 것으로 사료된다.

또한 ginsenoside류의 T cell 증식에 미치는 효과는 TNF- α 분비에 미치는 효과와 달리 protopanaxa-

diol 및 protopanaxatriol계 ginsenoside간에 일관성 있는 결과를 확인할 수 없었다.

한편 Rg₁의 경우 Hong 등(1995)은 Rg₁이 phorbol 12-myristate 13-acetate로 처리된 암세포주(Jurkat T cell)의 p56^{lck} kinase 활성을 유도하여 $25 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 약 30% 정도 세포 증식을 촉진한 것으로 보고하였으며,¹⁹⁾ Kenarova 등(1990)도 10 mg/kg 으로 i.p. 투여된 *in vivo* 실험을 통해 Rg₁이 T cell의 증식을 유도한다고 제시하였다.²⁰⁾ 또한 Rg₁의 경우 protein kinase C 매개에 의한 간암세포주의 증식을 유도하는 것으로 보고되고 있다.²¹⁾ 그러나 본 실험의 경우, 시험농도(75 및 $100 \mu\text{g/ml}$)에서 유의적인 변화를 관찰할 수 없었으며, $5 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ 의 저농도에서도 동일한 결과를 얻을 수 있었다(Data not shown). 따라서 이와같은 결과로 볼 때 ginsenoside류가 나타내는 작용은 TNF- α 억제효과에서와 마찬가지로 mitogen의 종류 및 세포의 종류에 따라 다양하게 나타날 수 있는 것으로 판단되며, 각각의 경우에 대한 구체적인 연구의 필요성이 요구된다.

요 약

인삼 사포닌류들의 TNF- α 분비억제 효과를 조사해 본 결과 protopanaxadiol계 ginsenoside(Rb₁과 Rb₂)가 TNF- α 분비를 억제하는 것으로 나타났다. 또한 Rb₁과 Rb₂의 IC₅₀ 값은 각각 $55.8 \pm 2.1 \mu\text{g/ml}$ ($48.0 \pm 2.1 \mu\text{M}$)와 $31.6 \pm 1.2 \mu\text{g/ml}$ ($27.9 \pm 1.7 \mu\text{M}$)로서 대표적인 스테로이드계 항염제인 prednisolone의 효과($21.7 \pm 3.9 \mu\text{M}$)와 동등한 것으로 보이며, 이들 억제 농도에서 Rb₁과 Rb₂는 세포의 생존율에 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다. 또한 T cell proliferation의 경우, Rb₁과 Rc는 고농도(75 및 $100 \mu\text{g/ml}$)에서 통계적으로 유의성 있는 증가작용을 보였으며, Rg₁은 유의적인 영향을 나타내지 않았다. 그러나 Rb₂는 동일 농도에서 TNF- α 억제 작용과 유사한 저해효과를 나타내어, 각 ginsenoside간에 다양한 결과를 확인할 수 있었다. 대조약물로서 prednisolone은 TNF- α 억제작용보다 1000배 이상 강한 효과(IC₅₀= 6.1 ± 1.3 nM)를 나타내었다.

문 헌

- 1) Li, C. P. and Li, R. C. : An introductory note to

- ginseng. *Am. J. Chinese Med.* **1**, 249 (1973).
- 2) Owen, R. T. : Ginseng: A pharmacological profile. *Drugs Today* **8**, 343 (1981).
 - 3) Sato, K., Mochizuki, M., Saiki, I., Yoo, Y. C., Samukawa, K. and Azuma, I. : Inhibition of tumor angiogenesis and metastasis by a saponin of *Panax ginseng*, Ginsenoside-Rb₂. *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 635 (1994).
 - 4) Matsuda, H., Samukawa, K. and Kubo, M. : Anti-inflammatory activity of ginsenoside Ro. *Planta Med.* **56**, 19 (1989).
 - 5) Petkov, V. D. and Mosharov, A. H. : Effect of standardized ginseng extract on learning, memory and physical capabilities. *Am. J. Chin. Med.* **15**, 19 (1987).
 - 6) Jie, Y. H., Cammisuli, S. and Baggolini, M. : Immunomodulatory effects of *Panax ginseng* C. A. Meyer in the mouse. *Agent. Action.* **15**, 386 (1984).
 - 7) Gupta, S., Agarwal, S. S., Epstein, L. B., Fernandes, G. and Good, R. A. : Panax: A new mitogen and interferon inducer. *Clin. Res.* **28**, 504A (1980).
 - 8) Chong, S. K. F., Brown, H. A., Rimmer, E., Oberholzer, V., Hindocha, P. and Walker-Smith, J. A. : *In vitro* effect of *Panax ginseng* on phytohemagglutinin-induced lymphocyte transformation. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.* **73**, 216 (1984).
 - 9) Park, J.-W., Han, I.-S., Suh, S.-I., Baek, W.-K., Suh, M.-H., Bae, J.-H. and Choe, B.-K. : Effects of ginseng saponin on the cytokine gene expression in human immune system. *Korean J. Ginseng Sci.* **20**, 15 (1996).
 - 10) Mochizuki, M., Yoo, Y. C., Matsuzawa, K., Sato, K., Saiki, I., Tono-oka, S., Samukawa, K. and Azuma, I. : Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponins, Ginsenoside-Rb₂, 20(R)- and 20(S)-Ginsenoside-Rg₃, of *Red ginseng*. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 1197 (1995).
 - 11) Shinakai, K., Akedo, H., Mukai, M., Imamura, F., Isoai, A., Kobayashi, M. and Kitagawa, I. : Inhibition of *in vitro* tumor cell invasion by Ginsenoside-Rg₃. *Jpn. J. Cancer Res.* **87**, 357 (1996).
 - 12) Terawaki, K., Nose, M., Kondo, T., Kojima, K., Mizukami, H. and Ogihara, Y. : Effect of karasurin-A on nitric oxide production by murine macrophages and mitogenic response of murine splenocytes *in vitro*. *Biol. Pharm. Bull.* **20**, 435 (1997).
 - 13) Nikaïdo, T., Ohmoto, T., Sankawa, U., Tanaka, O., Kasai, R., Shoji, J., Sanada, S., Hiai, S., Yokoyama, H., Oura, H. and Kawashima, Y. : Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase in *Panax ginseng* C. A. MEYER and *Panax japonicus* C. A. MEYER. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 1477 (1984).
 - 14) Seo, K. L., Koh, M. J., Lee, Y. Y., Park, I. and Lee, S. Y. : A study on the influence of ginseng components on cAMP-cGMP regulation mechanism. *Korean J. Ginseng Sci.* **7**, 95 (1983).
 - 15) Sunderkotter, C. : Steinbrink, K., Goebeler, M., Bhardwaj, R. and Sorg, C. : Macrophages and angiogenesis. *J. Leuk. Biol.* **55**, 410 (1994).
 - 16) Beutler, P. B. : *Tumor necrosis factors*: The molecules and their emerging role in medicine. Raven press, New York (1992).
 - 17) Zentella, A., Manogue, K. and Cerami, A. : The role of cachectin/TNF- α and other cytokines in sepsis. *Prog. Clin. Biol. Res.* **367**, 9 (1991).
 - 18) Sekut, L. and Connolly, K. M. : Pathophysiology and regulation of TNF- α in inflammation. *Drug News Perspect.* **9**, 261 (1996).
 - 19) Hong, H. Y., Na, D. S., Kwon, T. I., Choi, J. K. and Yoo, G. S. : Stimulatory effects of ginsenoside-Rg₁ on p56^{lck} kinase and cell proliferation in Jurkat T cells. *Korean J. Ginseng Sci.* **19**, 117 (1995).
 - 20) Kenarova, B., Neychev, H., Hadjiivanova, C. and Petkov, V. D. : Immunomodulating activity of ginsenoside Rg₁ from *Panax ginseng*. *Japan. J. Pharmacol.* **54**, 447 (1990).
 - 21) Kong, H. J., Lee, K. Y., Chung, E., Lee, Y. H., Kim, S. I. and Lee, S. K. : Protein kinase C-mediated stimulatory effect of ginsenoside-Rg₁ on the proliferation of SK-HEP-1. *Yakhak Hoeji* **39**, 661 (1995).